

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 742 286 A2**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
13.11.1996 Patentblatt 1996/46

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Anmeldenummer: 96107141.2

(22) Anmeldetag: 07.05.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
DE ES FR GB IT

(30) Priorität: 08.05.1995 DE 19516196

(71) Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH  
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:  
• Doppler, Clemens, Dr.  
68782 Brühl (DE)

- Fritton, Hans-Peter, Dr.  
69509 Mörlenbach (DE)
- Hinzpeter, Mathias, Dr.  
80689 München (DE)
- Leying, Hermann, Dr.  
83673 Bichl (DE)
- Wittor, Heiko  
82327 Tutzing (DE)

**(54) Verfahren zum quantitativen Nachweis von Nukleinsäuren**

(57) Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von spezifischen Polynukleotidsequenzen, das im wesentlichen dadurch gekennzeichnet ist, daß eine aus einer Mischung, wie z.B. einer biologischen Probe isolierte einzelsträngige Nukleinsäure, insbesondere mRNA, in Lösung mit einer im wesentlichen zur zu bestimmenden Sequenz komplementären Polynukleotid-Sequenz hybridisiert, anschließend an eine Festphase immobilisiert und die Menge an gebundenem Hybrid bestimmt wird. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, wenn die Bindung an die beschichtete Festplatte mittels einer spezifisch bindbaren chemischen Gruppe über eine Linkerfunktion gekoppelt an die zu bestimmende Sequenz oder die Polynukleotid-Sonden-Sequenz erfolgt.

EP 0 742 286 A2

## Beschreibung

Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von spezifischen Polynukleotid-Sequenzen, das im wesentlichen dadurch gekennzeichnet ist, daß eine aus einer Mischung, wie z.B. einer biologischen Probe isolierte einzelsträngige Nukleinsäure, insbesondere mRNA, in Lösung mit einer im wesentlichen zur zu bestimmenden Sequenz komplementären Polynukleotid-Sequenz hybridisiert, anschließend an eine Festphase immobilisiert und die Menge an gebundenem Hybrid bestimmt wird. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, wenn die Bindung an die beschichtete Festphase mittels einer spezifisch bindbaren chemischen Gruppe gekoppelt an die zu bestimmende Sequenz oder die Polynukleotid-Sonden-Sequenz erfolgt.

Eine Reihe von Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren sind heute bekannt. Diese beruhen in der Regel auf dem Prinzip der Hybridisierung, wobei in den meisten Fällen zunächst die Immobilisierung der zu bestimmenden Sequenz an die Festphase erfolgt und anschließend eine markierte Nukleinsäure-Probe zugegeben wird. Das Verfahren ist jedoch zeitaufwendig und für den ungeübten Praktiker nicht ohne weiteres mit Erfolg durchzuführen. Dies gilt insbesondere deshalb, da eine Hybridisierung an der Festphase wenig effizient verläuft.

Alternativ kann die Bestimmung von Nukleinsäuren über die in situ-Markierung der Proben-Nukleinsäure und die Fixierung an die Festphase, vermittelt über eine sequenzspezifische Nukleotidsequenz-Probe, erfolgen. In einem weiteren Verfahren werden zwei sequenzspezifische Proben für die zu bestimmende Nukleinsäure herangezogen. Sowohl die in situ-Markierung, als auch die Hybridisierung mit zwei Proben an der Festphase verlaufen oft nicht reproduzierbar, d.h. sind schwer oder nur mit großer Ungenauigkeit quantifizierbar, sind dazu experimentell aufwendig und somit für die Routine der klinischen Diagnostik wenig geeignet. Entsprechende Verfahren bzw. Varianten sind als Northern-Blot-Verfahren, Nuclease-Protection-Assay und quantitative RT-PCR-Verfahren bekannt und gehören heute zu den Standardmethoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989); R. E. Farrell, *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, Academic Press; J. W. Larrick, *Trends Biotechnol.* **10**, 146-152 (1992); E. S. Kawasaki, *A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis, M.A. et al) Academic Press).

Außerdem ist der Nachweis von Nukleinsäuren, insbesondere von mRNA im sogenannten Mikrotiterplatten-Verfahren bekannt, wobei die Hybridisierungsreaktion in Lösung erfolgt. In der Regel erfolgt dabei die Hybridisierung mit einer Biotin-markierten cDNA-Probe. Die Nukleinsäurehybride werden anschließend über die Biotin-markierung immobilisiert und mit einem Antikörper, der spezifisch DNA/RNA-Hybride bindet in einem herkömmlichen ELISA-Verfahren detektiert (C. O. Yehle et al., *Mol. Cell. Probes* **1**, 177-193 (1987); F. Countlee et al, *J. Biol. Chem.* **256**, 11601-11604 (1990); EP 0 336 454). Ferner ist es möglich anstatt eines Antikörpers ein geeignetes Detektionsprobe zu verwenden (sogen. Sandwichhybridisierung, EP 0 192 168).

Nachteilig bei Verfahren dieser Art ist jedoch zum einen, daß lediglich DNA als Fangprobe verwendet werden kann und zwar bedingt durch die Tatsache, daß der Nachweis über DNA/RNA-spezifische Antikörper erfolgt. Zum anderen ist das System unter Verwendung von herkömmlichen chromogenen Substraten nur wenig sensitiv. Darüber hinaus hat sich bei der Verwendung von photoreaktiven Substanzen als Markierungsreagenz für Nukleinsäureproben gezeigt, daß die Sensitivität unzureichend ist und die Handhabbarkeit entsprechender Bestimmungsverfahren zu wünschen übrig läßt (EP 0 237 833).

Auch ein erst kürzlich publiziertes Verfahren, bei dem RNA zunächst mit einer bereits im Mikrotiterplatten-well immobilisierten Fangprobe hybridisiert und anschließend mit einem fluoreszierenden interkalierendem Agens markiert und detektiert wird (T. Okamoto et al, *Anal. Biochem.* **221**, 202-204 (1994)), überkommt die Nachteile nur zum Teil. In Abhängigkeit von der Länge der Fangprobe führt dieses Verfahren zu hohem Hintergrundsignalen, da nicht nur die eigentlich nachzuweisende RNA, sondern auch die immobilisierte Fangprobe markiert wird.

Aufgabe der zugrundeliegenden Erfindung ist daher, ein Verfahren zu Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz zur Verfügung zu stellen, durch das die Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren überwunden werden, d.h. das insbesondere leicht durchführbar und automatisierbar ist und mit dem Nukleinsäuren quantitativ erfaßt werden können.

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz in einer Probenmischung, welches folgende Schritte umfaßt: Die Nukleinsäuren, insbesondere solche mit Poly-dA-Sequenzen (mRNA) werden isoliert und, soweit noch erforderlich, in einzelsträngige Nukleinsäuren überführt.

Anschließend erfolgt die Markierung der zu bestimmenden einzelsträngigen Nukleinsäure mit einer chemischen Gruppe, die vorzugsweise über eine Linkerfunktion an das Nukleinsäuremolekül, vorteilhafterweise in nicht-kovalenter gebunden ist bzw. assoziiert ist. Als chemische Gruppen sind solche geeignet, durch die entweder die Bindung an die Festphase vermittelt wird, oder die in einem direkten oder indirekten Verfahren detektierbar sind. Als immobilisierbare chemische Gruppen haben sich spezifisch bindbare Liganden wie z.B. Biotin oder Haptene wie z.B. Digoxigenin als vorteilhaft erwiesen.

Die markierte Nukleinsäure wird dann mit einer Polynukleotid-Sonde, die mindestens eine einzelsträngige Basensequenz umfaßt, die im wesentlichen komplementär zu der zu bestimmenden Sequenz ist, in Lösung unter Bedingungen, die für eine Hybridisierung zwischen der zu bestimmenden Sequenz und der komplementären Sondensequenz

günstig sind, hybridisiert. Die Sondensequenz ist mit einer zweiten, von der ersten unterschiedlichen chemischen Gruppe markiert. Hier kommen prinzipiell wie oben immobilisierbare oder bestimmbare chemische Gruppen in Betracht mit der Maßgabe, daß die erste und zweite Gruppe nicht identisch sein dürfen.

Das zweifach markierte Nukleinsäurehybrid wird über eine Markierungsgruppe an die Festphase gebunden, und über die andere wird die Menge an gebundenem Hybrid und somit die aus einem bestimmten Volumen isolierte Nukleinsäure quantifiziert.

Insbesondere als vorteilhaft hat sich das erfindungsgemäße Verfahren für die Quantifizierung von Poly-dA-Sequenzen beinhalten Nukleinsäuren wie mRNA erwiesen. Zur Hybridisierung können alle Arten von Proben verwendet werden, insbesondere anti-sense RNA und sogenannte "Peptide Nucleic Acid" (PNA). Dies ist von Bedeutung, da die Hybridisierung zwischen PNA- und RNA-Molekülen effizienter erfolgt als zwischen reinem RNA-Molekülen und diese wiederum effizienter hybridisieren als DNA- und RNA-Moleküle.

Der Einbau einer großen Anzahl von Markierungen in die nachzuweisenden RNA oder in die zum Nachweis benutzte DNA erlaubt eine Erhöhung des Meßsignals und damit insbesondere auch den chromogenen Nachweis von spezifischer mRNA, was bei den vorbekannten Verfahren nur bedingt möglich ist.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die zur Immobilisierung eingesetzte Probe nicht markiert wird. Dies führt zu einer erheblichen Reduktion des Hintergrundes.

Zudem ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren von Vorteil, daß die Hybridisierungsreaktion nicht an der Festphase, sondern in Lösung erfolgt. Hybridisierungen in Lösung erfolgen effizienter und erheblich schneller.

Neben den bereits angeführten chemischen Gruppen für die Markierung sind zudem, als bestimmbare Gruppen, enzymatisch aktive Gruppen wie beispielsweise Peroxidase oder  $\beta$ -Galactosidase, fluoreszierende Gruppen wie Fluorescein oder entsprechende Derivate, Chromophore verschiedenster Art oder lumineszierende Gruppen geeignet. Diese chemischen Gruppen können auf chemischem oder enzymatischem Weg in die Nukleinsäure eingebaut werden. Aber auch Radioisotope, beispielsweise eingebaut in Gegenwart einer terminalen Transferase bzw. T4 RNA-Ligase und eines entsprechend markierten Nukleotids bzw. Oligonukleotids, haben sich als geeignet erwiesen.

Außerdem kann ein Verfahren zum Einführen von nicht-radioaktiv markiertem Desoxynukleotiden in Nukleinsäuren bzw. RNA-Molekülen, die an ihrem 3'-Ende mindestens ein Desoxynukleotid enthalten, das eine nicht-radioaktive Markierungsgruppe trägt, verwendet werden. Ein entsprechendes Verfahren ist in der europäischen Patentanmeldung, Aktenzeichen 95 102 669.9, beschrieben.

Als besonders vorteilhaft hat sich erwiesen, wenn die Markierung der Nukleinsäure bzw. des Polynukleotids mit einem entsprechendem Hapten, wie beispielsweise Biotin oder Digoxigenin, komplexiert in eine Platin-enthaltende Verbindung, wie beispielsweise  $\{Pt(ethylendiamin)(Me_2SO)(haptent-NH(CS)NHCH_3)\}$ , durchgeführt wird. Für die Markierung wird eine entsprechend aktivierte Form solcher Platin-Komplexe verwendet. Solche Platin-Verbindungen haben sich als Linkerfunktion als besonders geeignet erwiesen und werden üblicherweise als "Universal Linkage System" (ULS) bezeichnet (EP 0 539 466 / WO 92/01699). Als detektierbare, d.h. als zweite chemische Gruppe haben sich insbesondere Platin-Komplex gekoppelte Gruppen als vorteilhaft erwiesen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist, wenn anstatt einer markierten, komplementären Polynukleotid-Sonde ein Peptid-Nukleinsäure-Derivat mit im wesentlichen zur bestimmenden Sequenz komplementären Basensequenz verwendet wird.

Die Festphase kann prinzipiell aus einer Reihe von Materialien und Formen bestehen, wie z.B. Mikropartikel, sogenannte Beads, porenhaltige oder nicht-permeable Membranen, der inneren Oberflächen von Reaktionsgefäßen wie Teströhrchen oder Mikrotiterplatten. Bevorzugt wird die vorliegende Erfindung an beschichteten Mikrotiterplatten (z.B. Nunclon) durchgeführt, insbesondere solche, bei denen die Beschichtung mit Streptavidin (SA) oder Avidin vorgenommen wurden. Entsprechende Maßnahmen bzw. Festphasen sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in EP 0344578 beschrieben.

Im folgenden werden die einzelnen Verfahrensschritte des erfindungsgemäßen Verfahrens genauer beschrieben:

Die Isolierung von ca. 10 - 20  $\mu$ g mRNA erfolgt über geeignete Beads entsprechend den Informationen zu dem mRNA-Isolierungskit von Boehringer Mannheim. Die Quantifizierung erfolgt bei  $OD_{260/280nm}$ , wobei 2  $\mu$ g mRNA in 500  $\mu$ l wässrige Lösung 0,1  $OD_{260nm}$  entsprechen.

Für die Markierung von ca. 10  $\mu$ g mRNA werden ca. 0,4  $\mu$ g Biotin-ULS zugegeben und ca. 60 Minuten bei 65°C inkubiert, anschließend mit Ethanol gefüllt und über  $OD_{260/280nm}$  quantifiziert.

Für die Hybridisierung werden ca. 100-150  $\mu$ l/well in einem geeigneten Hybridisierungspuffer vorgelegt und auf ca. 50°C vorgeheizt. Eine DIG-markierte DNA-Probe wird in denaturierter Form zum jeweiligen Reaktionsansatz gegeben, nachdem ca. 50 bis 1000 ng/well der Biotin-markierten mRNA einpipettiert wurden. Als besonders vorteilhafter Hybridisierungspuffer hat sich beispielsweise eine wässrige Lösung erwiesen, die ca. 50% Formamid, 0,1% Laurysarcosin und 0,02% SDS enthält. Die Hybridisierung erfolgt in der Regel zwischen 30 Minuten bis 4 Stunden - die Dauer der Hybridisierung hängt z.B. von der Länge der spezifischen Probesequenz als auch von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen ab - bei ca. 50°C bei 400 rpm. Diese Hybridisierungsbedingungen haben sich überraschenderweise für den spezifischen Nachweis von RNA als gut geeignet erwiesen. Dies ist deshalb überraschend, da auf der einen

Seite zwar die erforderliche Stringenz gewährleistet wird, auf der anderen Seite jedoch eine rasche Denaturierung von Protein, wie z.B. einer proteinartigen Beschichtung zu erwarten gewesen wäre.

Von dem Hybridisierungsansatz werden ca. je 100 µl in auf 50°C vorgeheizte SA-beschichtete Mikrotiterplattenwells pipettiert. Die Inkubation erfolgt bei 50°C/400 rpm in ca. 5 Minuten.

Anschließend wird dekantiert und 3 bis 6 mal bei Raumtemperatur gewaschen. Die anschließende Inkubation mit beispielsweise POD-markiertem DIG-Antikörper erfolgt in 30 Minuten bei 37°C und 400 rpm. Die anschließende Detektion erfolgt beispielsweise durch Einpipettieren von Luminol/Iodphenol und Messung nach ca. 3 Minuten.

Erläuterungen zu den Abbildungen:

**Abbildung 1:** Zeigt das Ergebnis von Beispiel 1-4, wobei ○ = β-Actin, ein Gen, welches permanent in Zellen vorkommt, und □ = CAT, ein Gen, welches nicht in eukaryotischen Zellen vorkommt bedeutet; gefüllte Symbole bedeutet "transfiziert".

**Abbildung 2:** Zeigt den Einfluß der Ampliconkonzentration, wobei ○ = 0,5 µl, □ = 1 µl, △ = 2 µl, ▽ = 5 µl und ◇ = 10 µl PCR-Fragment pro well bedeuten.

**Abbildung 3:** Zeigt den Einfluß der Ampliconkonzentration bei konstanter RNA-Konzentration (○ = 1000 ng, □ = 500 ng, △ = 250 ng, ▽ = 125 ng und ◇ = 62 ng Biotin (Bi)-mRNA/well).

**Abbildung 4:** Zeigt den Einfluß der Hybridisierungstemperatur, ○ = 50°C und □ = 37°C.

**Abbildung 5:** Zeigt den Einfluß der Formamid-Konzentration, ○ = 50% Formamid und □ = 10% Formamid.

**Abbildung 6:** Zeigt einen Vergleich zwischen dem erfindungsgemäßen Northern ELISA- und dem Northern Blot-Verfahren nach dem Stand der Technik, wobei mRNA aus 1 x 562 25:1 BioULS gelabelt ist und die Hybridisierung mit DIG-β-Actin PCR-Fragment (838 bp) bzw. CAT-Fragment durchgeführt wurde; ○ = β-Actin, □ = CAT.

**Abbildung 7:** Reaktionsschema des erfindungsgemäßen Verfahrens (Northern ELISA).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Gesamt mRNA wird über Biotin-Platinkomplexe (Bio-ULS®) mit Biotin markiert. Der Ansatz wird anschließend mit einer für ein Transkript-spezifischen, Digoxigenin (DIG) gelabelten DNA/RNA-Probe hybridisiert. Nach Bindung der mRNAs in einer Streptavidin (SA)-beschichteten Mikrotiterplatte MTP wird die spezifische RNA über DIG-POD detektiert.

In diesem Bericht wird die Messung von Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-spezifischer mRNA aus mit CAT-Plasmid transfizierten Zellen beschrieben.

## Material und Methoden

Plasmid pSV2CAT wurde erhalten von Dr. Kösters (Universitätsspital Zürich). DNA DIPSTICKS® zur Quantifizierung der mRNA stammen von Invitrogen (USA). Bio-ULS® stammt von Kretech (Holland). Reagenzien wie Northern Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5 x SSC, 12% Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer, 0,1% Laurylsarcosin, 0,02% SDS), mRNA Isolierungskit, Zellkulturmedien und Transfektionsreagenzien, Reagenzien zur Herstellung der DNA Probes, Streptavidin beschichtete MTP, DIG-POD, RNase-freier Konjugatverdünnungspuffer (40 mM KPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0,25% RSA, pH 6,8) Luminol/Iodphenol als Chemilumineszenzsubstrat und weitere Reagenzien stammen von Boehringer Mannheim. Chemilumineszenzmessungen wurden mit dem Microplate Luminometer LP 96P von Berthold durchgeführt.

## Beispiel 1

### Herstellung der DIG gelabelten Probes

Methoden zur Herstellung geeigneter Probes sind zum Beispiel Amplifikation über PCR, Random Primed Labeling und in vitro Transkription. Die hier verwendeten Probes wurden über geeignete Primer, die innerhalb der codierenden Sequenz der Target-RNA liegen, mittels PCR amplifiziert. Probe-Länge für Actin-Probe: 838 bp; für CAT-Probe: 367 bp (molares Verhältnis im PCR-Mix: dUTP/DIG-dUTP = 3/1). Über Ethidiumbromidfärbung wurde die Ampliconkonzentration abgeschätzt und mit Triethanolamin (TE) pH 8.0 auf ca. 20ng/µl eingestellt.

Beispiel 2**Transfektionsansatz**

Hela Zellen wurden mittels DOTAP nach Beipackzettel mit pSV2CAT transfiziert. Von den transfizierten Zellen und den unbehandelten Kontrollen wurde die mRNA mittels magnetic beads isoliert.

5 Kulturflaschen mit je  $5 \times 10^6$  Zellen/Flaschen (50 ml KM) wurden mit insgesamt 400 µg Plasmid während 6 Stunden transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und das Pellet in flüssigem Stickstoff gelagert ( $4,4 \times 10^6$  lebende Zellen, 80% tote Zellen). Analog wurde mit der nicht transfizierten Kontrolle verfahren ( $1,3 \times 10^7$  lebende Zellen, 5% tote Zellen).

Beispiel 3**mRNA Isolierung und Markierung mit Biotin**

Die mRNA wurde mittels magnet beads laut Beipackzettel aufgereinigt und die Konzentration über DNA DIPSTICK® bestimmt: Hela (+CAT):

10 µl mit  $c=360$  ng/µl, Hela (-CAT): 23 µl mit  $c=500$  ng/µl. Dann wurde mit Biotin-ULS im Verhältnis RNA/Bio-ULS = 20/(W/W) 1 Stunde bei 65°C gelabelt, über Ethanol-fällung aufgereinigt und in Wasser resuspendiert. Anschließend Konzentrationbestimmung über DNA DIPSTICKS® ergab: Hela (+CAT): 9 µl mit 200 ng/µl, Hela (-CAT): 29 µl mit 80 ng/µl.

Beispiel 4**Durchführung Northern ELISA**

In eine Zellkultur Rundbodenplatte wurden je 120 µl Northern Hybridisierungspuffer pipettiert und auf 50°C erwärmt. Die DIG markierten Probes aus Beispiel 1 wurden 5 min bei 100°C denaturiert und dann im Eisbad gekühlt. Zu dem Hybridisierungspuffer wurden je 600/150/37,5/9,375 ng Bi-mRNA pipettiert (Verdünnung in TE). Anschließend wurden je 4 µl DIG markierte DNA Probe zupipettiert. Nach 3 Stunden Hybridisierung bei 50°C und 400 rpm wurden je 100 µl in eine auf 50°C vorgeheizte tRSA-SA Platte pipettiert und die gemäß Beispiel 3 erhaltene RNA 5 min bei 400 rpm gebunden. Anschließend wurde dekantiert und 5 x mit 0,1 % SSC gewaschen. Einpipettieren von je 100 µl DIGPOD Konjugat (25 mU/ml) und 30 min Inkubation bei 400 rpm und 37°C. Anschließend wurde dekantiert und 3 x 0,1 SSC gewaschen. Einpipettieren von je 150 µl Luminol/Iodphenol und Messung nach 3 min.

Tabelle 1

Bi-mRNA [ng/well]	Nicht Transfizierte Zellen		Transfizierte Zellen	
	Actin	CAT	Actin	CAT
600,0000	411368,0000	9254,0000	301705,0000	86979,0000
150,0000	332754,0000	8991,0000	120236,0000	39765,0000
37,5000	128350,0000	9052,0000	54657,0000	19252,0000
9,37502	56151,0000	9001,0000	32221,0000	12011,0000
2,3440	38877,0000	8757,0000	26047,0000	8331,0000

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz in einer Probe, welches folgende Stufen umfaßt:

a) Isolierung der Nukleinsäuren und gegebenenfalls Überführung in einzelsträngige Nukleinsäuren;

b) Markierung der zu bestimmenden einzelsträngigen Nukleinsäure mit einer ersten chemischen, über eine Linkerfunktion gebundenen Gruppe;

c) Hybridisierung der markierten Nukleinsäure mit einer Polynukleotid-Sonde, die mindestens eine einzelsträngige Basensequenz umfaßt, die im wesentlichen komplementär zu der zu bestimmenden Sequenz und mit einer zweiten oder gegebenenfalls weiteren, von der ersten unterschiedlichen chemischen Gruppe markiert ist, in Lösung unter Bedingungen, die für eine Hybridisierung zwischen der zu bestimmenden Sequenz und der komplementären Sondensequenz günstig sind;

d) Immobilisierung des Nukleinsäure-Hybrids an eine Festphase über die erste chemische Gruppe und

e) Detektion der anderen chemischen Gruppe(n).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß mRNA isoliert wird und es sich bei der Polynukleotid-Sonde um ein Oligodesoxyribonukleotid, eine DNS, ein Oligoribonukleotid oder eine RNS handelt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Markierung der Nukleinsäure verwendete erste oder zweite chemische Gruppe ausgewählt werden aus einer enzymatisch aktiven Gruppe, einer fluoreszierenden Gruppe, einem Chromophor, einer lumineszierenden Gruppe, einem spezifisch bindbaren Liganden oder einem Radioisotop.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die erste über eine Linkerfunktion gebundene chemische Gruppe Biotin oder ein Biotinderivat darstellt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Peroxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Fluoreszein oder Digoxigen als zweite chemische Gruppe verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung mit einem aktivierten Platinkomplex durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste oder zweite chemische Gruppe auf chemischem oder enzymatischem Weg in die Nukleinsäure eingeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Markierung mit einer terminalen Transferase oder einer T4 RNA-Ligase und einem durch eine chemische Gruppe markierten Nukleotids oder Oligonukleotid durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich bei der markierten, komplementären Polynukleotid-Sonde um ein Peptid-Nukleinsäure-Derivat handelt.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine beschichtete Festphase verwendet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase mit Avidin, Streptavidin oder einem entsprechenden Derivat beschichtet ist und die Hybridisierung unter stringenden Bedingungen bei ca. 50°C vorgenommen wird.

12. Verfahren zur quantitativen Bestimmung einer spezifischen Polynukleotidsequenz in einer Probe, welches folgende Stufen umfaßt:

a) Isolierung der Nukleinsäuren und Überführung in einzelsträngige Nukleinsäuren;

b) Auswahl einer Polynukleotid-Sonde, die mindestens eine einzelsträngige Basensequenz umfaßt, die im wesentlichen komplementär zu der zu bestimmenden Sequenz ist;

c) Markierung der Nukleinsäure aus Schritt a) oder des Polynukleotids aus Schritt b) mit einer immobilisierbaren chemischen Gruppe, wobei es sich um über einen Platinkomplex gebundenes Biotin bzw. Biotinderivat handelt;

d) Hybridisierung der Nukleinsäure und des Polynukleotids in Lösung unter Bedingungen, die für eine Hybridisierung zwischen der zu bestimmenden Sequenz und der komplementären Sondensequenz günstig sind;

e) Immobilisierung des Nukleinsäure-Hybrids an eine Festphase über die immobilisierbare chemische Gruppe und

f) Detektion des Hybrids durch einen Antikörper, der spezifisch an DNA/RNA- oder RNA/DNA-Duplexe bindet und durch eine bestimmbare chemische Gruppe markiert ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der isolierten Nukleinsäure um solche mit Poly-dA-Sequenzen handelt.

Abb. 1

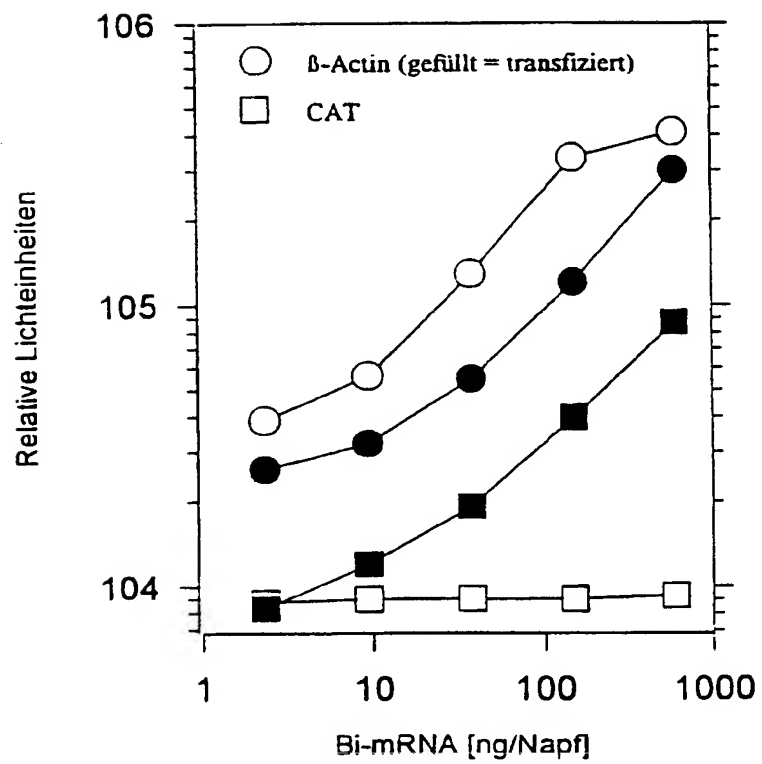




Abb. 2

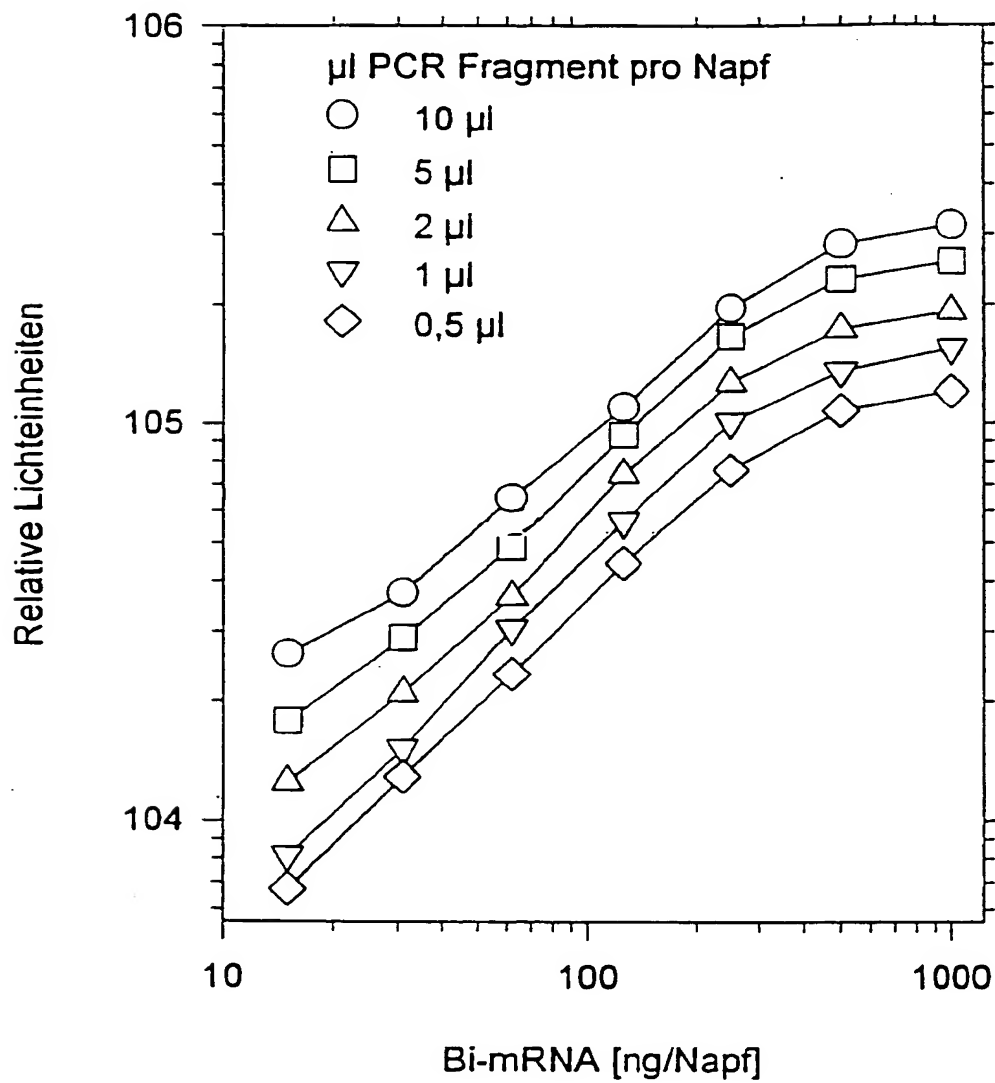


Abb. 3

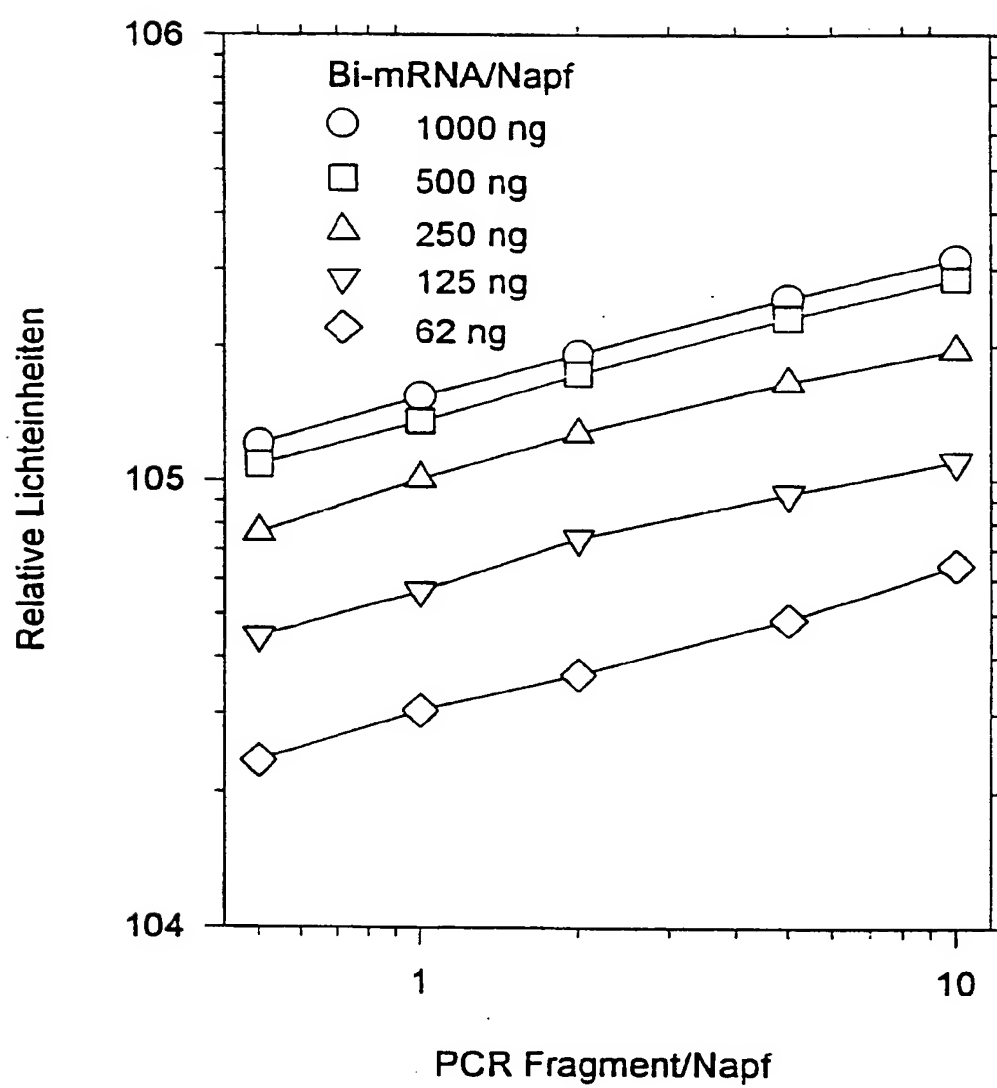


Abb. 4

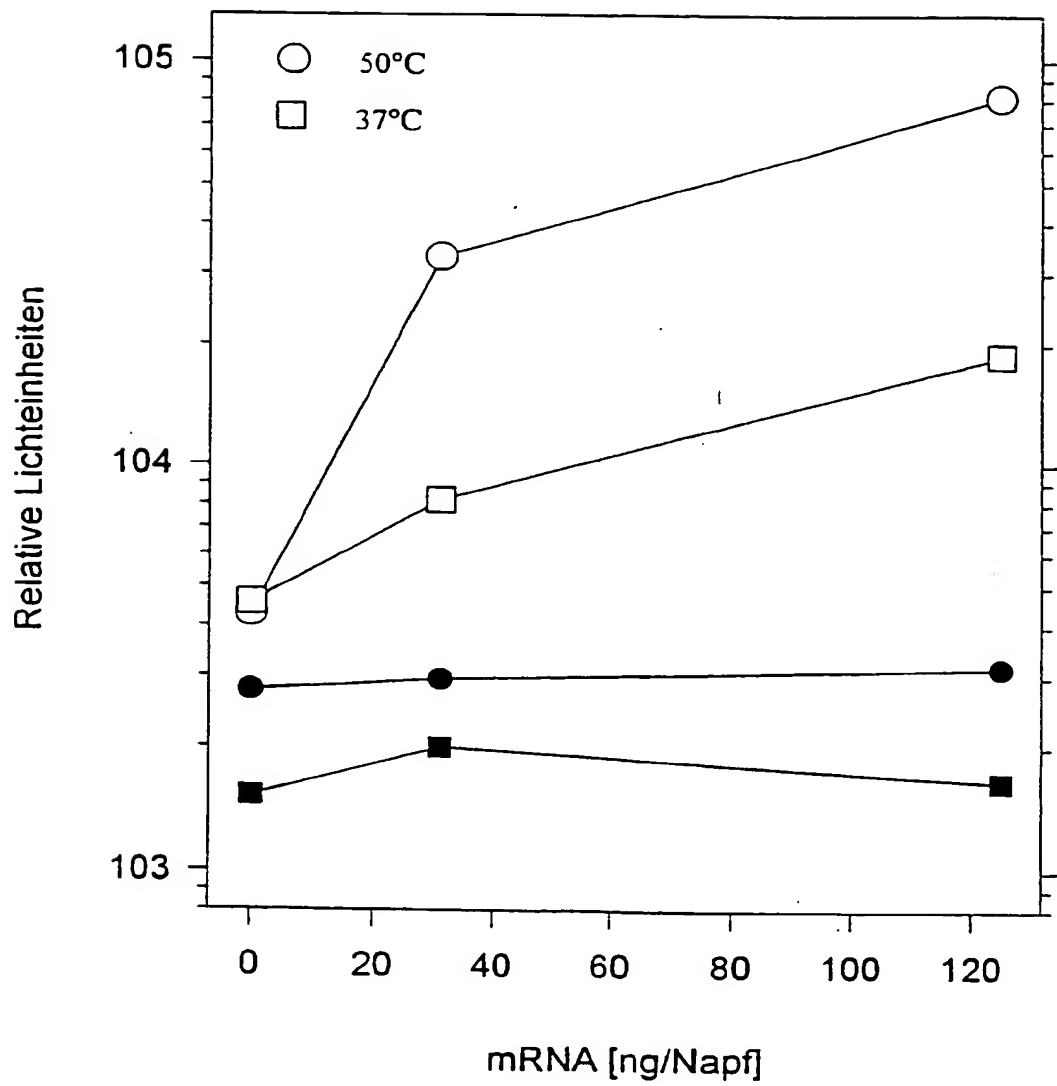


Abb. 5

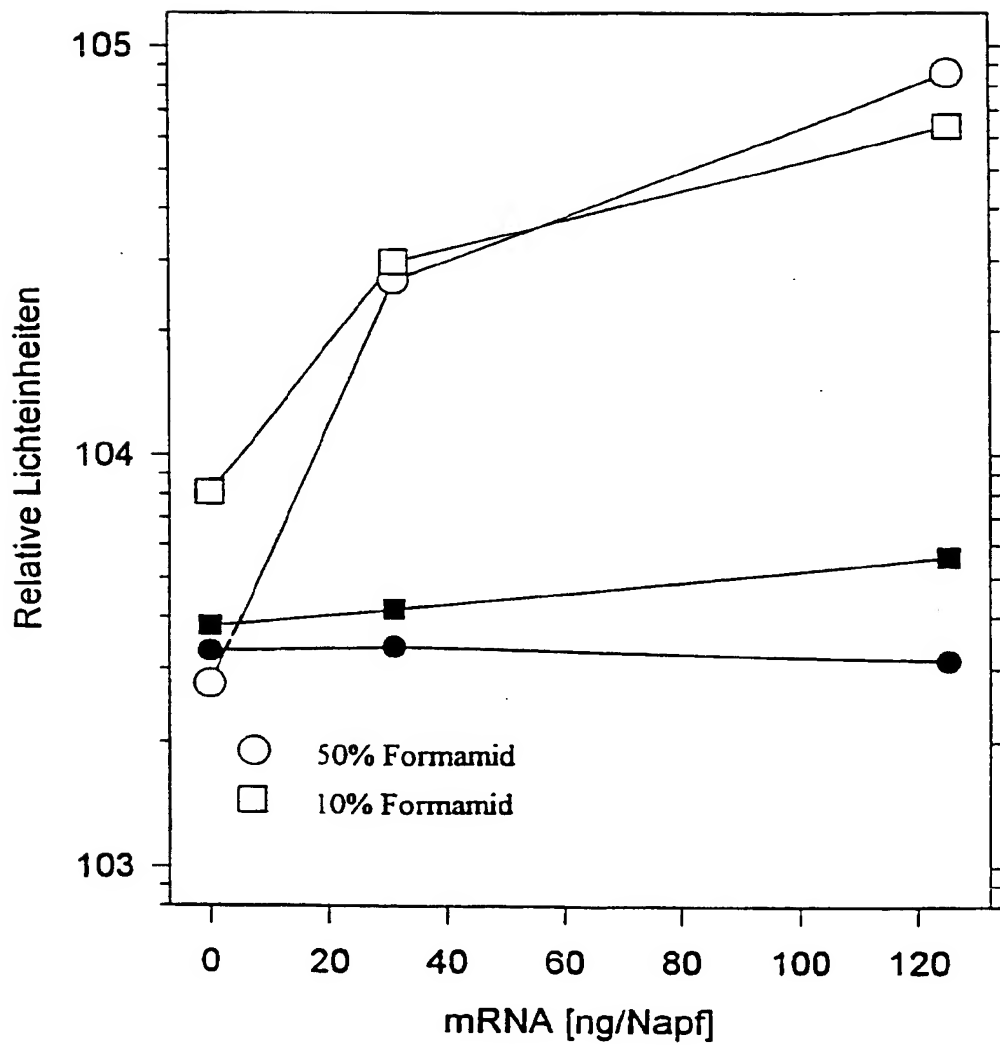


Abb. 6

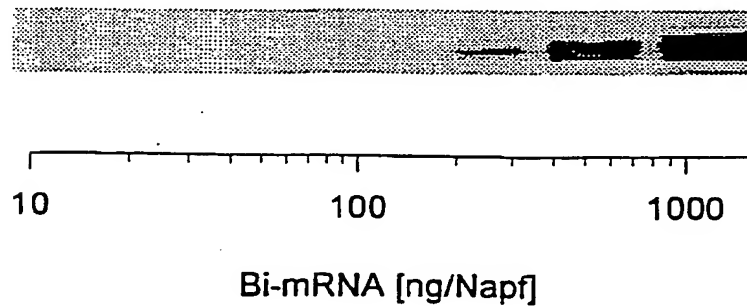
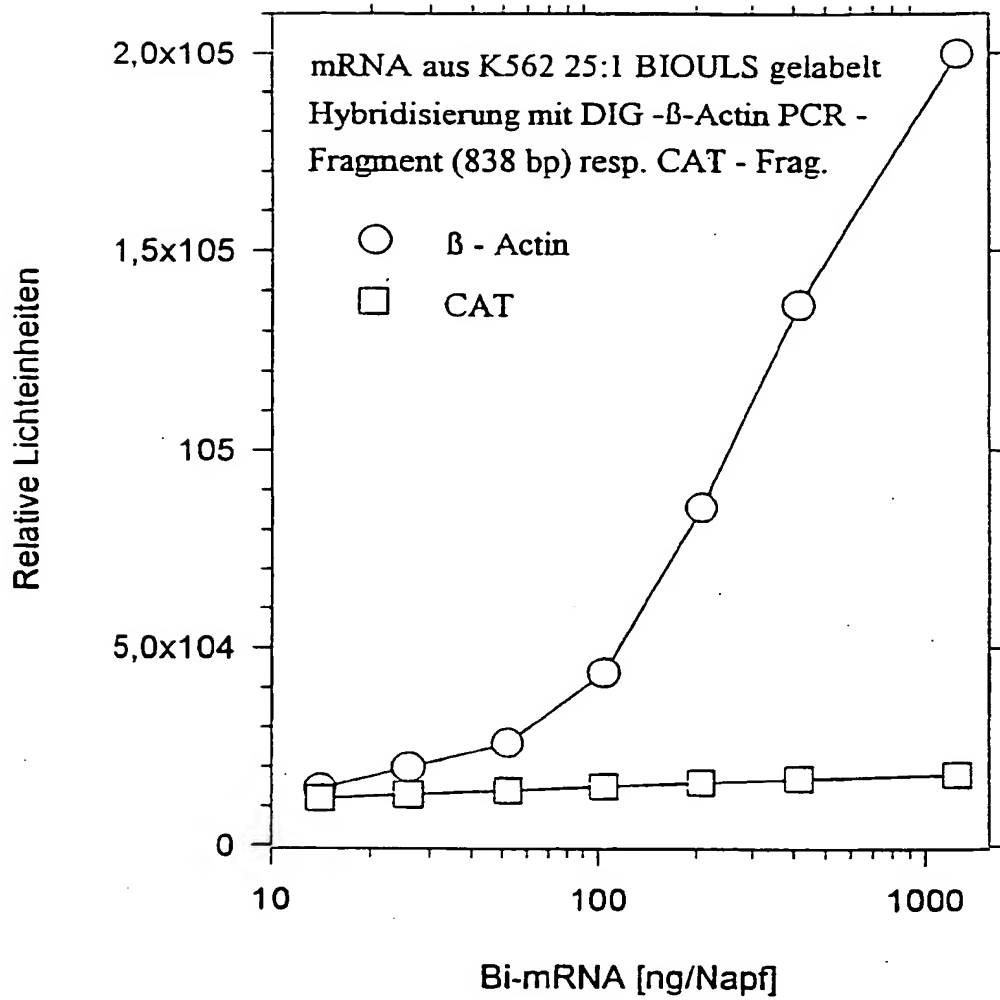
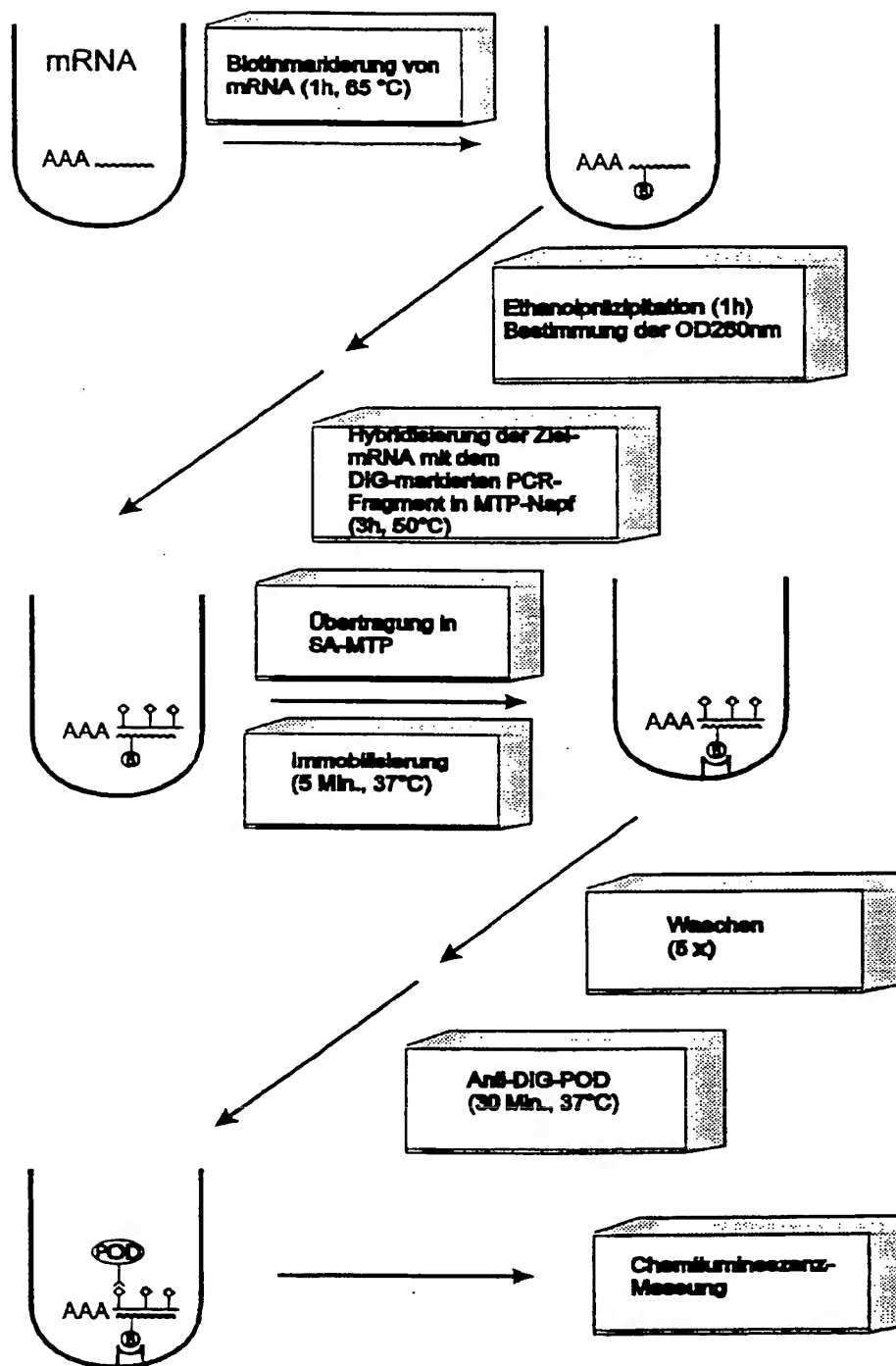


Abb. 7



(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11)

**EP 0 742 286 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:  
18.07.2001 Patentblatt 2001/29

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/68**

(43) Veröffentlichungstag A2:  
13.11.1996 Patentblatt 1996/46

(21) Anmeldenummer: 96107141.2

(22) Anmeldetag: 07.05.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
DE ES FR GB IT

(30) Priorität: 08.05.1995 DE 19516196

(71) Anmelder: Roche Diagnostics GmbH  
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:  
• Doppler, Clemens, Dr.  
68782 Brühl (DE)

- Fritton, Hans-Peter, Dr.  
69509 Mörlenbach (DE)
- Hinzpeter, Mathias, Dr.  
80689 München (DE)
- Leying, Hermann, Dr.  
83673 Bichl (DE)
- Wittor, Heiko  
82327 Tutzing (DE)

### (54) Verfahren zum quantitativen Nachweis von Nukleinsäuren

(57) Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von spezifischen Polynukleotidsequenzen, das im wesentlichen dadurch gekennzeichnet ist, daß eine aus einer Mischung, wie z. B. einer biologischen Probe isolierte einzelsträngige Nukleinsäure, insbesondere mRNA, in Lösung mit einer im wesentlichen zur zu bestimmenden Sequenz kom-

plementären Polynukleotid-Sequenz hybridisiert, anschließend an eine Festphase immobilisiert und die Menge an gebundenem Hybrid bestimmt wird. Als besonders geeignet hat sich erwiesen, wenn die Bindung an die beschichtete Festplatte mittels einer spezifisch bindbaren chemischen Gruppe über eine Linkerfunktion gekoppelt an die zu bestimmende Sequenz oder die Polynukleotid-Sonden-Sequenz erfolgt.

EP 0 742 286 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 96 10 7141

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D,X	EP 0 237 833 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 23. September 1987 (1987-09-23) * Ansprüche 1-7 * * Seite 3 - Seite 16 *	1-5,7,8, 10,11	C12Q1/68
Y	* Ansprüche 1-7 * * Seite 3 - Seite 16 *	6,12	
D,Y	EP 0 539 466 A (AMC AMSTERDAM ;UNIV LEIDEN (NL)) 5. Mai 1993 (1993-05-05) * Seite 3, Zeile 40 - Zeile 58 *	6,12	
A	EP 0 523 557 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 20. Januar 1993 (1993-01-20) * das ganze Dokument *	1-7	
A	EP 0 324 468 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19. Juli 1989 (1989-07-19) * das ganze Dokument *	1-7	
D,A	YEHL ET AL.: "A solution hybridization assay for ribosomal RNA from bacteria using biotinylated DNA probes and enzyme-labelled antibody to DNA:RNA" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, Bd. 1, 1987, Seiten 177-193, XP001002148 * das ganze Dokument *	12	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C12Q
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>28. Mai 2001</b>	Prüfer <b>Botz, J</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument * Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1603 03/02 (P01C03)



**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 96 10 7141

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

28-05-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0237833 A	23-09-1987	AT 84574 T	15-01-1993
		AU 6972487 A	10-09-1987
		CA 1290664 A	15-10-1991
		DE 3783485 A	25-02-1993
		DE 3783485 T	06-05-1993
		DK 112187 A	06-09-1987
		ES 2053457 T	01-08-1994
		FI 870922 A	06-09-1987
		GR 3006858 T	30-06-1993
		JP 2613203 B	21-05-1997
		JP 62282599 A	08-12-1987
		NO 870612 A	07-09-1987
		US 4968602 A	06-11-1990
		ZA 8701555 A	25-11-1987
EP 0539466 A	05-05-1993	NL 9001639 A	17-02-1992
		DE 69123251 D	02-01-1997
		DE 69123251 T	28-05-1997
		GR 3022581 T	31-05-1997
		US 5580990 A	03-12-1996
		AT 145403 T	15-12-1996
		AU 8286391 A	18-02-1992
		DK 539466 T	05-05-1997
		ES 2097213 T	01-04-1997
		WO 9201699 A	06-02-1992
		US 6133038 A	17-10-2000
		US 5714327 A	03-02-1998
		US 5985566 A	16-11-1999
EP 0523557 A	20-01-1993	DE 4123540 A	21-01-1993
		AT 132538 T	15-01-1996
		AU 640089 B	12-08-1993
		AU 1953492 A	29-04-1993
		CA 2073989 A	17-01-1993
		DE 59204886 D	15-02-1996
		DK 523557 T	06-05-1996
		ES 2083629 T	16-04-1996
		FI 923239 A	17-01-1993
		IE 922298 A	27-01-1993
		JP 2644419 B	25-08-1997
		JP 5199899 A	10-08-1993
		KR 9604039 B	25-03-1996
		NO 922794 A	18-01-1993
		NZ 243525 A	25-11-1993
		ZA 9205259 A	17-01-1994

EPO FORM P/481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 96 10 7141

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

28-05-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0324468	A	19-07-1989	DE	3800644 A	20-07-1989
			JP	1215300 A	29-08-1989
			US	5354657 A	11-10-1994
			-----		

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82